

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental untuk menguji aktivitas antibakteri dari kombinasi ekstrak daun *Jatropha gossypifolia* (EDJG) dan daun *Persea americana* (EDPA) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

4.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biologi Sub Mikrobiologi FMIPA, Universitas Negeri Malang.

4.3 Alat Penelitian

4.3.1 Pengujian Difusi Cakram

1. Inkubator
2. Autoklaf
3. Mikropipet
4. *Laminar Air Flow*
5. Tabung reaksi
6. *Hot Plate*
7. Bunsen
8. Pipet volume
9. Cawan petri
10. Jarum ose
11. *Yellow tip*
12. *Blue tip*
13. Kapas lidi steril

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan uji yang digunakan adalah ekstrak yang telah didapatkan dari penelitian sebelumnya yaitu, ekstrak daun *Jatropha gossypifolia* oleh Dilla Novita (2015), sedangkan ekstrak daun *Persea americana* oleh Thakira (2016). Mikroba uji yang akan digunakan adalah bakteri

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi dan Parasitologi Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Sampel Bakteri

Bakteri *S.aureus* dan *E.coli* diisolasi pada media Mueller Hinton Agar (MHA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 Jam.

4.4.3 Pengujian Difusi Cakram

1. Mueller Hinton Agar
2. Aquades steril
3. Mueller Hinton Broth
4. DMSO 10%
5. Kloramfenikol 30 µg

4.5 Sterilisasi Bahan dan Alat

Semua alat yang digunakan, terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu dengan cara sterilisasi kering dan basah:

4.5.1 Sterilisasi dengan Pemanasan

Sterilisasi dengan pemanasan dapat membunuh bakteri, karena dapat menggumpalkan (koagulasi) protoplasma dari bakteri.

4.5.1.1 Pemanasan Dalam Nyala Api

Pemanasan dalam nyala api dipakai untuk steril jarum inokulasi, pipet dan sebagainya. Benda yang terkontaminasi karena berhubungan dengan penderita atau hewan yang terkena infeksi, sering kali dibakar untuk menghilangkan sumber penularan infeksi (Entjang, 2003).

4.5.1.2 Sterilisasi Oven Pemanas

Oven berfungsi untuk mensterilkan alat-alat gelas yang tahan terhadap panas. Digunakan pada sterilisasi udara kering dengan membebaskan alat-alat dari segala macam mikroba tanpa kelembapan. Cara menggunakannya yaitu dengan memasukkan alat-alat yang telah dibungkus dengan kertas yang akan disterilkan kedalam oven dan menyusunnya pada rak, kemudian memanaskannya diatas api (Ririn, 2016).

4.5.2 Sterilisasi Basah

Autoklaf atau dikenal dengan metode sterilisasi panas basah biasanya sterilisasi yang menggunakan bantuan alat autoklaf dengan tekanan

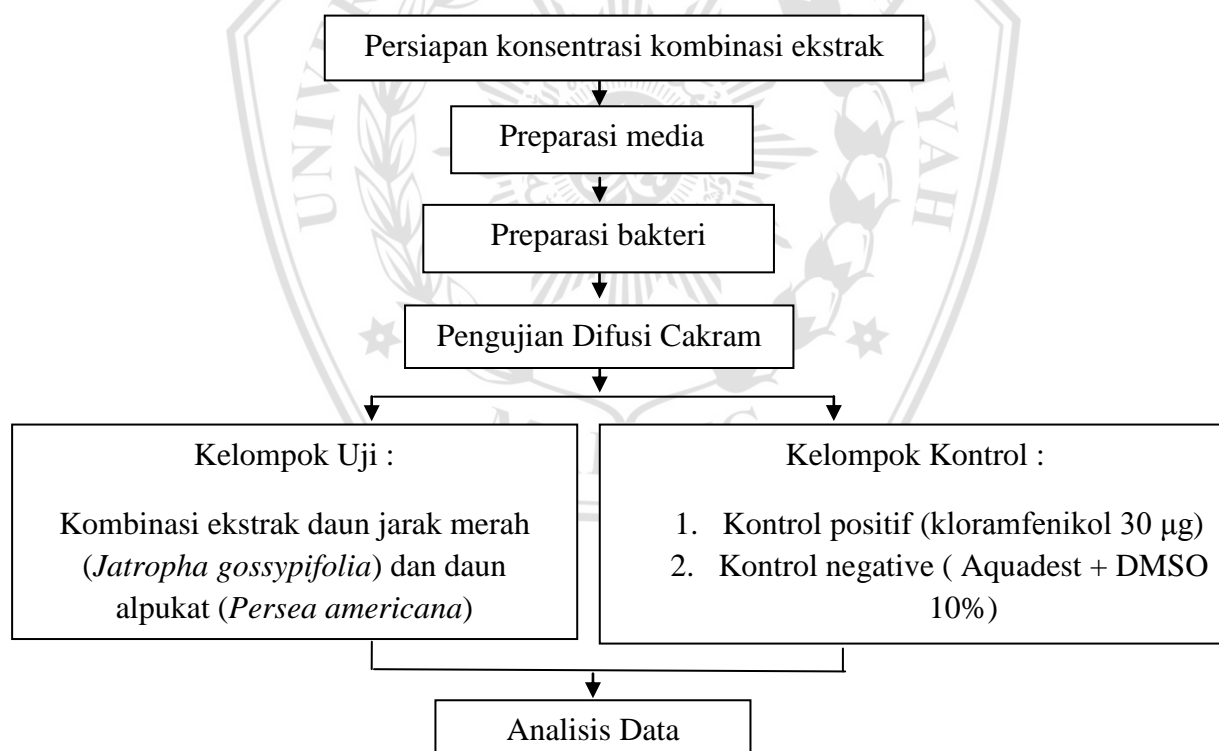
bersaturasi. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Prinsip kerja alat ini yaitu dengan menggunakan uap air panas bertekanan dengan membunuh dan menghilangkan kotoran dan mikroba yang terdapat pada alat atau bahan yang akan digunakan (Ririn, 2016).

4.6 Metode Penelitian

4.6.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri untuk zona hambat bakteri *S.aureus* dan *E.coli* dari kombinasi ekstrak daun *Jatropha gossypifolia* dan *Persea americana* secara in vitro dengan metode difusi cakram. Penelitian ini menggunakan dua perlakuan yaitu kelompok uji dan kelompok kontrol. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu persiapan konsentrasi kombinasi ekstrak dan pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram.

4.6.2 Kerangka Operasional



Gambar 4.1Skema Kerangka Operasional

4.7 Variabel Penelitian

4.7.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah komponen senyawa kimia pada kombinasi EDJG dan EDPA dengan perbandingan konsentrasi *Jatropha gossypifolia* : *Persea americana* untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu, 25 mg/mL : 70 mg/mL, 25 mg/mL : 35 mg/mL, 50 mg/mL : 35 mg/mL sedangkan untuk bakteri *Escherichia coli* yaitu 25 mg/mL : 50 mg/mL, 25 mg/mL : 25 mg/mL, 50 mg/mL : 25 mg/mL.

4.7.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah lebar diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening disekitar senyawa uji yang ada pada media agar sebagai parameter untuk menentukan daya hambat minimum senyawa dari ekstrak.

4.8 Prosedur Kerja

4.8.1 Tahap Persiapan

4.8.1.1 Persiapan Ekstrak Etanol Daun *Jatropha gossypifolia*

Sampel yang digunakan adalah daun *Jatropha gossypifolia*, daun yang telah disortir kemudian dicuci dengan air sampai bersih serta dipisahkan ranting-rantingnya. Daun yang sudah dicuci kemudian dianginkan pada suhu kamar selama 2 jam setelah itu dilakukan pengeringan lagi pada suhu 50° C selama 2-3 hari sampai kering. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan cara digiling sampai menjadi serbuk halus dan diayak dengan ayakan mesh 20 dan 40, serbuk kemudian disimpan pada suhu kamar.

4.8.1.2 Persiapan Ekstraksi Daun *Jatropha gossypifolia* (Remaserasi Non-Kinetik)

Timbang 100 gram serbuk tanaman *Jatropha gossypifolia* yang sudah dihaluskan dan masukkan kedalam beaker glass. Maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 mL, kemudian diamkan selama 24 jam, saring dan tampung filtrat. Residu hasil maserasi pertama kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 mL, diamkan selama 24 jam, saring dan tampung filtrat. Residu hasil maserasi ke dua ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 ml, diamkan selama 24 jam, saring dan tampung filtrat. Filtrat hasil penyaringan dikumpulkan

menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh larutan ekstrak kental, setelah itu dipindahkan ke cawan dan dikeringkan di oven pada suhu 40° C.

4.8.1.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Persea americana*

Daun alpukat dibersihkan terlebih dahulu kemudian dikeringkan dengan cara dianginkan. Daun alpukat yang sudah kering kemudian dihaluskan. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, yaitu 500 gram simplisia kering daun alpukat direndam dengan 2 L etanol 96% dan diamkan selama 24 jam. Saring hasil maserasi dengan menggunakan corong *Buchner*, tampung filtrat. Residu ditambahkan etanol 96% sebanyak 1,5 L diamkan selama 24 jam, saring dan tampung filtrat. Langkah tersebut diulangi sekali lagi, filtrat yang didapat dikumpulkan menjadi satu dan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai 1/3 bagian dan diuapkan menggunakan *waterbath* sampai didapat ekstrak kental.

4.8.1.4 Persiapan Konsentrasi Larutan Uji

Berdasarkan dari penelitian sebelumnya diketahui konsentrasi tiap tanaman sebagai antibakteri sehingga pada konsentrasi persiapan konsentrasi larutan uji kombinasi ekstrak menggunakan perbandingan EDJG dan EDPA sebagai berikut :

- 1). Perbandingan konsentrasi untuk bakteri *S.aureus* :
 - a). konsentrasi 1 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 25 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 70 mg/mL.
 - b). konsentrasi 2 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 25 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 35 mg/mL.
 - c). konsentrasi 3 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 50 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 35 mg/mL.
- 2). Perbandingan konsentrasi untuk bakteri *E.coli* :
 - a). konsentrasi 1 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 25 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 50 mg/mL.
 - b). konsentrasi 2 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 25 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 25 mg/mL.

- c). konsentrasi 3 : jarak merah (*Jatropha gossipyfolia*) 50 mg/mL dan alpukat (*Persea americana*) 25 mg/mL.

4.8.1.5 Pembuatan Larutan Uji

Langkah-langkah pembuatan konsentrasi larutan uji dibuat, sebagai berikut:

- 1). Konsentrasi larutan untuk uji bakteri *S.aureus* :
 - a. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 25 mg dan EDPA sebanyak 70 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 1 EDJG 25 mg/mL dan EDPA 70 mg/mL.
 - b. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 25 mg dan EDPA sebanyak 35 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 2 EDJG 25 mg/mL dan EDPA 35 mg/mL.
 - c. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 50 mg dan EDPA sebanyak 35 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 3 EDJG 50 mg/mL dan EDPA 35 mg/mL.
- 2). Konsentrasi larutan untuk uji bakteri *E.coli* :
 - a. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 25 mg dan EDPA sebanyak 50 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 1 EDJG 25 mg/mL dan EDPA 50 mg/mL.
 - b. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 25 mg dan EDPA sebanyak 25 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 2 EDJG 25 mg/mL dan EDPA 25 mg/mL.
 - c. Ditimbang ekstrak EDJG sebanyak 50 mg dan EDPA sebanyak 25 mg, setelah itu dilarutkan dengan DMSO 10% sebanyak 1 mL sehingga didapat larutan uji dosis 3 EDJG 50 mg/mL dan EDPA 25 mg/mL.

4.8.1.6 Preparasi Media *Mueller Hinton Agar*

Dalam penelitian ini digunakan satu media yakni *Mueller Hinton Agar* dalam pembuatan suspensi bakteri menggunakan aquadest steril dengan meremajakan bakteri sehari sebelum penggunaan. Pembuatan media MHA dengan melarutkan media Mueller Hinton Agar 38 g (*beef extract* 2 g, *casamino acid* 17,5 g, *starch* 1,5 g, agar 17 g) dilarutkan dalam 1000 mL aquadest dipanaskan sampai larut. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Zahro & Agustini, 2013).

4.8.1.7 Preparasi Media *Mueller Hinton Broth*

Media *Mueller Hinton Broth* dibuat dengan cara melarutkan 2,1 g kedalam 100 mL aquadest, kemudian dipanaskan sampai larut. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit (Zahro & Agustin, 2013).

4.8.1.8 Pembuatan Standar Mc Farland

Standar Mc. Farland digunakan untuk standarisasi jumlah bakteri dalam cairan dengan membandingkan kekeruhan uji suspensi dengan standar Mc. Farland. Standar Mc. Farland adalah larutan kimia yang terdiri atas BaCl_2 1% sebanyak 50 μL dan H_2SO_4 1% sebanyak 9950 μL , reaksi antara kedua bahan kimia ini menghasilkan endapan halus BaCl_2 . Sebelum menggunakan, Mc.Farland harus dikocok dulu sampai homogen kemudian ditambah aliquot kedalam tabung yang digunakan untuk menyiapkan suspensi inokulum, tabung harus ditutup rapat agar tidak terjadi evaporasi. Sebelum digunakan suspensi harus dikocok dengan baik agar barium sulfat terdistribusikan dengan baik. Standar yang paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis adalah 0,5 Mc. Farland yang disiapkan untuk uji antimikroba. Standar Mc Farland harus disimpan dalam posisi tegak pada suhu 4°-25°C dan terhindar dari cahaya matahari. Dalam kondisi seperti ini standar Mc Farland dapat bertahan selama 12 minggu dari tanggal awal pembuatan. (Dalinn, 2002)

4.8.1.9 Preparasi Bakteri

Proses peremajaan bakteri dibuat dengan cara mengambil 1-2 ose kemudian dimasukkan pada tabung yang berisi media MHB. Kemudian inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sebelum membuat suspensi bakteri, siapkan terlebih dahulu standar Mc. Farland dengan tingkat kekeruhan 10^8 CFU/ mL. Lakukan pengenceran untuk pembuatan suspensi bakteri dengan cara ambil bakteri uji hasil peremajaan dengan 1 mL kemudian masukkan kedalam 5 mL aquadest dalam tabung (tabung A), kocok dengan shaker dan bandingkan dengan standar Mc. Farland 0,5 dengan tingkat kekeruhan $1,5 \times 10^8$ CFU/ mL. Kemudian dari tabung A dilakukan penggoresan pada media MHA yang diambil dengan kapas lidi steril dan digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal, lalu putar cawan 90°. Lanjutkan goresan sampai selesai, kemudian bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.8.1.10 Pewarnaan Bakteri Uji

Pewarnaan Gram merupakan metode pewarnaan yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi pada bakteri yang akan digunakan serta mengelompokkan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan lewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil isolat bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek. Isolat bakteri kemudian ditetesi ungu violet dan dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Isolat bakteri kemudian ditetesi dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya isolate bakteri ditetesi dengan alkohol 95% selama 30 detik, kemudian dialiri air dan dianginkan hingga kering. Isolat bakteri kemudian ditetesi dengan safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan kertas penghisap dan dikeringkan, kemudian dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mengikat warna kristal violet, sedangkan bakteri gram negative ditandai dengan warna merah muda yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna Kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin (Hadioetomo, 1993).

4.8.2 Tahap Pengujian

4.8.2.1 Pengujian Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Dengan Difusi Cakram

a). Prosedur pengujian bakteri *S.ureus* secara difusi cakram dilakukan secara aseptis didalam Laminar Air Flow (LAF) sebagai berikut :

1. Siapkan larutan uji masing-masing yang telah dimasukkan kedalam ephendrop dengan perbandingan dosis 25 mg/mL : 70 mg/mL, 25 mg/mL : 35 mg/mL, 50 mg/mL : 35 mg/mL.
2. Lakukan peremajaan bakteri dan preparasi media.
3. Siapkan kombinasi larutan uji dengan dosis yang telah ditentukan, kemudian kertas cakram kosong diletakkan diatas cawan petri yang telah berisi kombinasi larutan uji kemudian direndam selama 20 menit

dengan pengulangan sampai jenuh atau sampai kertas cakram tidak mampu menyerap cairan uji.

4. Bakteri yang telah di preparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu letakkan pada tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar bakteri yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Lalu oleskan pada permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) dicawan petri kemudian diratakan.

5. Kertas cakram yang telah berisi dosis kombinasi ekstrak diletakkan diatas permukaan media secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang menyala. Agar kertas cakram dan media kontak dengan baik, kertas cakram dapat ditekan dengan pelan menggunakan pinset pada permukaannya. Atur jarak antara satu cakram dengan cakram yang lain agar tidak terlalu dekat maupun terlalu jauh. Kontrol positif yang digunakan yaitu antibiotik kloramfenikol.

6. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

7. Pengujian antibakteri dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya besar zona hambat atau area bening yang ada disekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan millimeter (mm).

8. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali.

b). Prosedur pengujian bakteri *E.coli* secara difusi cakram dilakukan secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* (LAF) sebagai berikut :

1. Siapkan larutan uji masing-masing yang telah dimasukkan kedalam ephendrop dengan perbandingan dosis 25 mg/mL : 50 mg/mL, 25 mg/mL : 25 mg/mL, 50 mg/mL : 25 mg/mL.

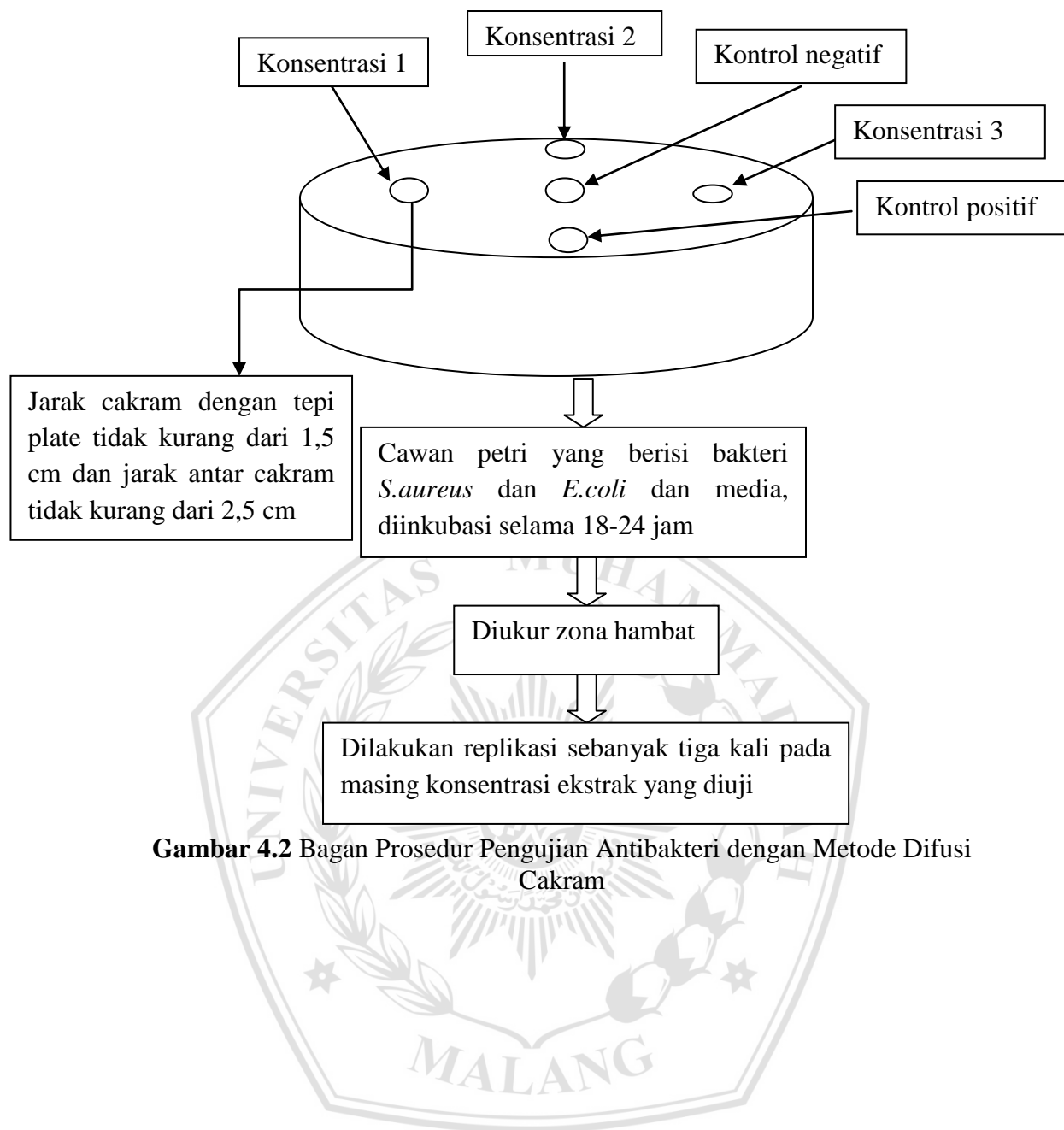
2. Lakukan peremajaan bakteri dan preparasi media.

3. Siapkan kombinasi larutan uji dengan dosis yang telah ditentukan, kemudian kertas cakram kosong diletakkan diatas kaca arloji yang telah berisi kombinasi larutan uji kemudian diremdam selama 20 menit dengan pengulangan sampai jenuh atau sampai kertas cakram tidak mampu menyerap cairan.

4. Bakteri yang telah di preparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu letakkan pada tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar bakteri yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Lalu oleskan pada permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) dicawan petri kemudian diratakan.
5. Kertas cakram yang telah berisi dosis kombinasi ekstrak diletakkan diatas permukaan media secara aseptis didalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang menyala. Agar kertas cakram dan media kontak dengan baik, kertas cakram dapat ditekan dengan pelan menggunakan pinset pada permukaannya. Atur jarak antara satu cakram dengan cakram yang lain agar tidak terlalu dekat maupun terlalu jauh. Kontrol positif yang digunakan yaitu antibiotik kloramfenikol.
6. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Pengujian antibakteri dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya besar zona hambat atau area bening yang ada disekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan millimeter (mm).
8. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali.

4.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan caramelakukan pengamatan terhadap pengukuran diameter zona hambat pada daerah berwarna bening yang terbentuk dari masing-masing konsentrasi pada kombinasi ekstrak etanol daun tanaman *Jatropha gossypifolia* dan daun *Persea americana* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.



Gambar 4.2 Bagan Prosedur Pengujian Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram